

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-502993

(43)公表日 平成9年(1997)3月25日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 48/00	ADU	9051-4C	A 6 1 K 48/00	ADU
C 1 2 N 15/09		9283-4C	35/76	
// A 6 1 K 35/76		9284-4C	39/00	Z
38/00		9284-4C	39/39	
38/21		9284-4C	39/395	U

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-510150	(71)出願人	トランジェーヌ、ソシエテ、アノニム フランス国ストラスブール、リュ、ド、モ ルシャイム、11
(86) (22)出願日	平成6年(1994)9月28日	(72)発明者	アクル、ブルース フランス国ストラスブール、リュ、エ ル、-アプフェル、20
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)3月28日	(74)代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(86)国際出願番号	P C T / F R 9 4 / 0 1 1 3 3		
(87)国際公開番号	W O 9 5 / 0 9 2 4 1		
(87)国際公開日	平成7年(1995)4月6日		
(31)優先権主張番号	9 3 / 1 1 6 0 1		
(32)優先日	1993年9月29日		
(33)優先権主張国	フランス (F R)		
(81)指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, J P		

(54)【発明の名称】 免疫または炎症応答の調節による抗がん遺伝子療法

## (57)【要約】

免疫および/または炎症応答調節遺伝子の全部または一部についてコードする1以上の遺伝子を含んだDNA断片がゲノム中に挿入されたウイルスベクターが、哺乳動物におけるがん治療用薬物の製造に用いられる。本発明は、特に、サイトカイン、特にインターロイキン-2、4、5、6または7、ガンマインターフェロン、コロニー刺激因子あるいはタイプβ腫瘍壊死因子についてコードする遺伝子がゲノム中に挿入された、ボックスウイルスに由来するウイルスベクターの用途に関する。

【特許請求の範囲】

1. 哺乳動物におけるがん治療用医薬品の製造に関する、細胞表面共刺激分子、ケモカイン、リンパ球表面マーカーに対するモノクローナル抗体、感染性生物（細菌、ウイルスまたは寄生虫）に特徴的なスーパー抗原、およびアジュバント機能を有するポリペプチドから選択される、免疫および／または炎症応答を調節する物質の全部または一部についてコードする1以上の遺伝子を含んだDNA断片がゲノム中に挿入されたウイルスベクターの使用。
2. 医薬品が非経口投与、特に静脈内または筋肉内投与用である、請求項1に記載のウイルスベクターの使用。
3. 細胞表面共刺激分子が主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）のクラスIおよびII抗原、マーカーCD27、CD28、CD30およびCD40に関するリガンド、リンパ球機能抗原タイプ1（LFA-1）と、細胞間付着分子タイプ1（ICAM-1）から選択される、請求項1または2に記載のウイルスベクターの使用。
4. ケモカインがPF-4（血小板因子-4）、RANTESおよびACT-2から選択される、請求項1または2に記載のウイルスベクターの使用。
5. モノクローナル抗体が抗CD2、抗CD3、抗CD28および抗CD40モノクローナル抗体から選択される、請求項1または2に記載のウイルスベクターの使用。
6. 哺乳動物におけるがん治療用医薬品の製造に関する、少なくとも1つのサイトカインについてコードする1以上の遺伝子を含んだDNA断片がゲノム中に挿入され、上記医薬品が非経口投与、特に静脈内または筋肉内投与用である、ウイルスベクターの使用。
7. サイトカインがインターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因

子（CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）および補体断片C5aから選択される、請求項6に記載のウイルスベクターの使用。

8. サイトカインがインターロイキン-2、-4、-5、-6および-7、

ガンマインターフェロン、顆粒球・マクロファージタイプコロニー刺激因子（GM-CSF）並びに腫瘍壊死因子タイプβ（TNFβ）から選択される、請求項7に記載のウイルスベクターの使用。

9. ヒトにおけるがん治療用医薬品の製造に関する、請求項1～8のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

10. 哺乳動物における固形がん腫瘍の治療用医薬品の製造に関する、請求項1～9のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

11. ウイルスベクターがポックスウイルス、アデノウイルス、レトロウイルスおよびヘルペスウイルスから選択されるウイルスに由来する、請求項1～10のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

12. ウイルスベクターが非組込み性ベクターである、請求項1～11のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

13. ウイルスベクターが非複製性ベクターである、請求項1～12のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

14. ウイルスベクターがポックスウイルスに由来する、請求項11に記載のウイルスベクターの使用。

15. ウイルスベクターがトリポックスウイルスに由来する、請求項14に記載のウイルスベクターの使用。

16. ウイルスベクターがワクシニアウイルスに由来する、請求項14に記載のウイルスベクターの使用。

17. ウイルスベクターが腫瘍特異性抗原についてコードする遺伝子を更に

含んでなるものである、請求項1～16のいずれか一項に記載のウイルスベクターの使用。

18. 発現に必要な要素の制御下に置かれた、がん細胞の破壊に関与する少くとも1つの物質についてコードする1以上の遺伝子を含むDNA断片がゲノム中に挿入され、前記物質が特異的にがん腫瘍に送達される、がん細胞に正の親和性を示すウイルスベクターの使用。

19. 発現に必要な要素の制御下に置かれた、免疫および/または炎症応答

を調節する物質についてコードする 1 以上の遺伝子を含む DNA 断片がゲノム中に挿入され、免疫および／または炎症応答を調節する前記物質ががん腫瘍に特異的に送達される、請求項 18 に記載のウイルスベクターの使用。

20. ウイルスベクターがポックスウイルスに由来する、請求項 18 または 19 に記載のウイルスベクターの使用。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 免疫または炎症応答の調節による抗がん遺伝子療法

本発明は遺伝子療法によるがんの治療方法に関する。更に詳しくは、本発明は免疫および／または炎症応答を調節する物質についてコードする遺伝子を腫瘍細胞に送達するためのウイルスベクターの使用に関する。

がんは細胞増殖のコントロールの喪失に起因する疾患であると通常認められている。その原因は多く、特に細胞遺伝子の機能性の欠陥（例えば正常遺伝子の体細胞変異による潜在的発がん遺伝子の活性化；細胞遺伝子の発現の調節解除；腫瘍抑制遺伝子の発現の阻害）またはウイルス遺伝子の望ましくない発現による。

この20年の間に、ほとんどの腫瘍細胞は、正常細胞では相当物を見い出せない腫瘍特異性抗原（非自己抗原）をそれらの表面で出すことが明らかにされた。これらの腫瘍特異性抗原は、例えば（i）発現が胎児胚期に生じて、誕生時にはそれが消失するような程度まで退行する細胞抗原、（ii）通常非常に低いレベルで発現され、高レベルで発現されるときには腫瘍の特徴になる抗原、または（iii）構造またはコンホメーションが変えられた細胞抗原である。

原則として、これら腫瘍特異性抗原の異常発現は非自己抗原により誘導される場合と同タイプの免疫応答を誘発することができる。この応答では好中球、リンパ球、単球およびマクロファージを含めた免疫系の細胞のすべてを使う。

一般的に言えば、2つの大きなタイプの免疫応答、即ちBリンパ球による抗体の産生に相当する体液型応答と、エフェクター細胞、本質的に細胞毒性T（ $T_C$ ）リンパ球、NK（ナチュラルキラー）細胞および食細胞に関連した細胞毒性効果を有する細胞性免疫応答がある。調節細胞は双方のタイプの免疫応答、即ち本質的にTヘルパー（ $T_H$ ）リンパ球およびTサブプレッサー（ $T_S$ ）リンパ球を調節

する。

免疫応答は、異なる細胞タイプの協力を特に要する極端に複雑な現象である。この協力は細胞間伝達物質として関与する可溶性分子であるサイトカインの中間作用から生じる。

体液性免疫に関して、Bリンパ球は未変性コンホメーションの非自己抗原によ

り刺激される。この刺激に应答して、Bリンパ球はこれらの外来抗原に対する特異的抗体を産生する。

他方、Tリンパ球は主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の抗原と一緒に抗原提示細胞（APC）の表面で提示される非自己抗原の分解産物であるペプチドによってのみ刺激される。

Tリンパ球の活性化は、それらの増殖を誘発させて、それらの機能、特に細胞毒性リンパ球による感染または腫瘍細胞の破壊を行う効果を有している。

スーパー抗原と称される1クラスだけの抗原は、常法どおりに提示されない。事実、スーパー抗原は事前にペプチドへと分解されることなくMHCの分子と結合することができ、しかも同時に古典的抗原の経路で活性化されるTリンパ球よりも大量のTリンパ球を活性化できる。このため、これらのスーパー抗原は強い免疫応答を誘導することができる。

炎症はダメージ、例えば創傷または感染に対する体の応答により誘発される。炎症応答は、免疫系の細胞を炎症の現場に引き寄せる効果を有する化学走性または化学誘起作用分子（ケモカインという用語でも表わされる）の放出を特に含めた一連の反応からなる。

活性化されたTリンパ球は、MIF（遊走阻止因子）のような細胞遊走現象を阻止する分子を特に産生する。その名称が示すように、MIFはマクロファージの遊走を阻止して、その結果炎症部位でそれらの集中を促進する役割を有しており、そのためそれらは最適の条件下でそれらの食作用機能を発揮する。

明らかにされたがんの場合において、免疫系自体に欠陥があるか、あるいは腫瘍細胞の表現型変化が免疫応答を誘発する上で阻害するかまたは十分でないために、抗腫瘍免疫応答には欠陥がある。

がんを治療するために、インターロイキン-2（IL-2）、インターフェロン（IFN- $\gamma$ ）または腫瘍壊死因子（TNF）タイプ $\alpha$ のようなサイトカインの全身および反復用量を患者に投与することにより抗腫瘍免疫反応を強化することは既に提案されている（Rosenberg, 1992, J. Clin. Oncology, 10, 180-199）。残念ながら、副作用は無視しうるものではなく、それには悪心から死さえにも及ぶ。

更に、このような治療は極端に高価であることがわかっている。

免疫賦活分子についてコードする遺伝子の患者の細胞中へのex vivo 移入に基づく類似した考え方も、やはり提案されていた代替法を背景としている；これは発現目的で行われる。簡単に言えば、(i) 腫瘍細胞または腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が患者から取り出される；(ii) それらはIL-2、IL-4、IL-6およびTNF $\alpha$ のような免疫賦活分子についてコードする遺伝子を保有したベクターによりex vivo でトランスフェクトされる；(iii) それらはそれらが由来する患者の中に再移植される。

前記のような臨床試験は、現在まで、ささやかなまたは期待はずれの結果を与えてきただけである。多くの研究者は低レベルの発現を報告している (Anderson, 1993, Science, 259, 1391-1392)。更に、このようなプロトコールは大規模に適用することが困難である。事実、それは治療される患者毎に細胞のバルク培養を要し、コスト、時間およびリスク観点からこれには欠点を伴う。加えて、インビトロ培養期に新たな腫瘍抗原変異体の発現がないことは保証できない。

かなり最近になり、Plautz et al. (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4645-4649) はマウス腫瘍細胞への組換えレトロウイルスによる直接インビトロトランスフェクションについて報告した。後者はマウスMHC表面抗原についてコードする

相補的DNA (cDNA) の発現を行えるように変えられた。選択された抗原は同種異系であり、即ちそれは宿主マウスに対して遺伝的バリエーションを示し、この抗原を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を刺激する目的である。この方法では各患者毎に細胞系を作る必要性を解消しているが、しかしながらそれは外科的にアクセスしうる腫瘍のみに適用できる。

腫瘍をもつマウスに投与されたワクシニアウイルスはがん組織に優先的に感染することがわかった。ワクシニアウイルスが免疫賦活分子についてコードする遺伝子を保有しているとき、腫瘍増殖の阻害と一部の場合には完全な退縮が観察される。

このため、本発明の目的は、哺乳動物におけるがん治療用医薬品の製造に関する、がん細胞の破壊に関与する少くとも1つの物質 (agent)、例えばがん細胞

に毒性である物質または免疫および／または炎症応答を調節する物質、ついてコードする1以上の遺伝子を含んだDNA断片がゲノムに挿入されたウイルスベクターの使用である。

“ウイルスベクター”とは、真核細胞中への関心ある遺伝子の移入とその他のその発現を行えるようにゲノムが修正されたウイルスを意味すると理解されている。本発明の関係で使用できるウイルスベクターは、特にポックスウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルスに由来する。有利には、当該ベクターは非組込み性かつ非複製性であって、宿主細胞または起源が例えばカナリヤポックスウイルスのような非ヒトであるものである。このようなベクターとそれらの製造技術は当業者に公知である。

アデノウイルスに由来するウイルスベクターに関して、これは5'末端に位置するE1A遺伝子を少くとも欠いて、アデノウイルスの複製に必須のトランス活性化タンパク質についてコードする、アデノウイルスの完全ゲノムからなることが好ましい。このため、それはE1A遺伝子の発現産物をトランス (trans) で

供給する相補細胞系で増殖される。アデノウイルスゲノムの他の領域、特に非必須E3領域と、一方で欠けた機能がトランスで補われるかぎりウイルス複製に必須の他の領域も修正または欠失させてよいことは自明である。それにもかかわらず、このようなベクターはキャプシドに必須の配列、即ち5'および3' ITR (逆方向末端反復) とキャプシド領域を含んでいる。様々なアデノウイルスベクターとそれらの製造技術は慣用的であり、GrahamおよびPreveet (Methods in Molecular Biology, vol. 7, p. 109-128; Ed: E. J. Murey, The human Press Inc. ) に示されている。

特に好ましい態様によれば、本発明の目的に有用なウイルスベクターはポックスウイルス、特にワクシニアウイルスまたはトリポックスウイルス、例えばカナリヤポックスウイルスに由来する。後者が好ましい。

異種遺伝子を発現できるワクシニアウイルスを得るための一般的条件は、欧州特許EP 83, 286および出願EP 206, 920に記載されている。有利な態様によれば、上記DNA断片はウイルス遺伝子を不活化して組換えワクシニア



ウイルスの選択を容易にするためにワクシニアウイルスのTK遺伝子中に挿入される。

本発明が向けられている目的によれば、ウイルスベクターは組換えウイルスの単離および精製の工程を容易にするために選択マーカー遺伝子の発現用のブロックを更に含むことができる。特に抗生物質G418に対する耐性を付与するNe<sup>o</sup>遺伝子、あるいはガンシクロピアまたはアシクロピアのようなあるヌクレオシドアナログに対する感受性を付与する1型単純ヘルペスウイルス(HSV-1)TK遺伝子が挙げられる。

このようなウイルスベクターは、免疫および/または炎症反応における望ましい調節効果と協力して作用できる、上記以外の遺伝子も含んでいてよい。当該遺伝子は腫瘍特異性抗原の全部または一部についてコードするものであることが有

利である。更に詳しくは、子宮のがんに関与するHPVウイルス、特にタイプ16または18のE6およびE7タンパク質、MUC1タンパク質、更に詳しくは乳癌に関与する後者の反復領域と、最後に結腸直腸がんに関与するGA. 733. 2抗原が挙げられる。その抗原についてコードする配列は先行技術で記載されている。例えば相補的プライマーを用いるPCR(ポリメラーゼ鎖反応)技術でそれらを単離すること、それらを選択されたウイルスベクター中に調節遺伝子の上流または下流で挿入すること、しかもそれらの発現にとり必要な要素のコントロール下にそれらを置くことは、当業者の能力内に属する。

本発明の目的にとり、以下調節物質と称される、免疫および/または炎症応答を調節する物質の全部または一部についてコードする1以上の遺伝子を含んだDNA断片が、上記遺伝子の移入および発現用のビヒクルであるウイルスベクター中に導入される。DNA断片をウイルスベクター中に挿入する方法は当業者に公知である。

更に、調節物質についてコードする遺伝子には、ゲノムタイプ(天然遺伝子のイントロン群の全部または一部を含んでいる)、イントロンを欠く相補的DNA(cDNA)タイプ、またはミニ遺伝子タイプ、即ち少なくとも1つのイントロンを含む混合タイプがある。それは哺乳動物で見られるような天然調節物質、この

ような物質の一部、多様な起源の配列の融合から生じるキメラ分子、あるいは改善または修正された生物学的性質を示す変異体についてコードすることができるが、しかしながらこれらの分子は炎症応答で免疫調節機能または調節機能を発揮できねばならない。このような変異体は、上記調節物質についてコードする遺伝子の1以上のヌクレオチドの変異、欠失、置換および／または付加により得られる。当該遺伝子は(i)細胞内にあるかまたは外部媒体中に分泌される可溶性分子、あるいは(ii)膜に固定され、このためそれを発現する細胞の表面に存在する分子についてコードすることができる。

調節物質についてコードする遺伝子は、一般的に行われている慣用的技術に従い、クローニング、PCRまたは化学合成により得られる。

勿論、DNA断片は転写の調節に適した要素と、調節物質についてコードする遺伝子の発現を行う翻訳開始および終結シグナルを含むことができる。これらの要素の中では、プロモーター領域が特に重要であると思われる。

一般的に言えば、治療が望まれる哺乳動物の細胞、好ましくはヒト細胞で機能するプロモーター領域を用いる。それには、上記遺伝子の発現を天然で支配するプロモーター領域、あるいは真核またはウイルス遺伝子に由来する異なる起源のプロモーター領域がある。更に、プロモーター領域は調節配列、例えば転写活性化要素(エンハンサー)またはある細胞シグナルに応答する配列を含むように修正してもよい。

選択されたプロモーター領域は構成的でもまたは調節的であってもよく、後者の場合にはある組織特異性または事象特異性細胞シグナルに応答して調節的である。治療される腫瘍が特定の細胞タイプに由来するときには、組織特異性プロモーター領域を用いることが有利である。一方、(例えば、腫瘍細胞により通常放出される増殖因子の存在により調節しうる)特定の腫瘍シグナルに応答するプロモーターの使用が有利とわかっているが、その理由はその発現が腫瘍細胞に限定されるからである。

このようなプロモーターは通常当業者に公知である。特に、SV40(シミアンウイルス40)、HMG(ヒドロキシメチルグルタリル補酵素A)およびTK

(チミジンキナーゼ) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) およびMo-MLV (モロニーネズミ白血病ウイルス) LTR (Long terminal repeats)、アデノウイルスMLP (主要後期プロモーター)、ワクシニアウイルス7.5 KおよびH5Rプロモーター、 $\alpha_1$ -抗トリプシン、アルブミン、凝固因子IXおよびトランスフェリン遺伝子の肝臓特異性プロモーターと、リンパ球で支配する

遺伝子の発現を行う免疫グロブリン遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらの例に限定されない。

本発明の関係において、DNA断片は調節物質についてコードする1以上の遺伝子を含むことができ、これは独立してまたは一緒になってそれらの発現を行える要素のコントロール下に置いてもよい。言い換えれば、DNA断片は調節物質についてコードする1以上の遺伝子の発現用のカセットを1以上含んでもよい。

更に、DNA断片は細胞から当該調節物質の分泌を行わせるシグナル配列を含んでもよい。それには上記調節物質についてコードする遺伝子の天然シグナル配列、または真核細胞で機能する異種シグナル配列、例えばトランスフェリンまたは $\alpha_1$ -抗トリプシンについてコードする遺伝子のシグナル配列がある。

免疫および/または炎症応答を調節する物質とは、特に

- 主要特異性抗原に対する抗体の産生を増幅するようにBリンパ球を活性化することで体液性免疫応答を刺激する；
- 腫瘍細胞に対する有意の細胞毒性または遅延型過敏症(DTH)応答を誘発するようにTリンパ球を活性化することによって細胞性免疫応答を刺激する；
- 免疫系の細胞を腫瘍部位に運ぶように炎症応答を誘導または刺激する；

または

- 現実の腫瘍部位または腫瘍部位近くに免疫系の細胞を留めておくように細胞遊走現象を阻止する

ことができる分子を意味すると理解されている。

上記機能を少なくとも示す分子は、特に(I) サイトカイン、(II) 細胞表面共

刺激分子、(III)ケモカイン、(IV)リンパ球表面マーカーに対するモノクローナル抗体、(V)感染性生物(細菌、ウイルスまたは寄生虫)に特徴的なスーパー抗原、および(VI)アジュバント機能を有するポリペプチドから選択される。

(I)

本発明の目的に有利なサイトカインは、免疫系の細胞、特にリンパ球およびマクロファージ、あるいはそれらの前駆幹細胞(progenitor stem cells)により産生されて、免疫系の細胞の活性化、免疫系の細胞間のシグナルの輸送と、幹細胞から血流の成熟細胞への細胞分化に関与するものである。

本発明の目的に有用なサイトカインに関しては、特に以下のものが挙げられる：

(1) インターロイキン(IL)。現在、16種のインターロイキンが明らかにされている。それらは多面的効果を発揮することから、それらに特定の機能を割り当てることは特に困難である。本発明の関係では、すべてのインターロイキンに関心があるが、以下が更に具体的に挙げられる：

- 細菌成分による刺激後にマクロファージから産生されるIL-1。その役割はリンパ球活性化のレベルで発揮される。IL-1は前炎症分子でもあり、それ自体ケモカイン産生を誘導する。

- 活性化Tリンパ球の増殖に関与し、IFN- $\gamma$ と共同してBリンパ球による抗体産生を刺激するIL-2。更に、一部の研究では、それが腫瘍で産生されるとリンパ球の化学走性役割を有することを示す傾向がある。

- 活性化Tリンパ球により産生され、Bリンパ球と一部の場合にはTリンパ球の増殖を刺激するIL-4

- 好酸性白血球の増殖および分化と、小さな程度で抗体産生を促進するIL-5

- マクロファージおよびTリンパ球により産生されるIL-6。それは多面的効果を有し、特にTリンパ球の細胞毒性活性と抗体産生の刺激剤として関与する。それは前炎症分子でもある。

- 骨髄の間質の細胞により産生され、前BおよびTリンパ球の増殖に関与する

## IL - 7

- 活性化マクロファージにより産生され、IFN -  $\gamma$ 産生を誘導するIL - 12

(2) 抗ウイルスおよび免疫調節性質を有するインターフェロン (IFN)。それらは食細胞を活性化し、MHCクラスIおよびII表面抗原の発現を高め、しかも腫瘍細胞に対するNK細胞の細胞毒性を刺激することができる。3つの主要クラスのIFNがあり、各々が本発明の関係で関心あるものである。これらの異なるクラス $\alpha$ 、 $\beta$ および $\gamma$ は各々多くのサブタイプを含んでいる。

(3) 造血幹細胞の成熟と、血流の成熟細胞へのそれらの分化に関与するコロニー刺激因子CSF。GM-CSF、G-CSFおよびM-CSF (各々顆粒球-マクロファージ、顆粒球およびマクロファージに関する) はこれらの因子がそれらの影響を及ぼす細胞タイプと成熟段階に応じて区別される。

(4) 腫瘍壊死因子 (TNF)。マクロファージにより産生されるTNF $\alpha$ とTリンパ球により産生されるTNF $\beta$ に区別される。双方ともマクロファージおよびリンパ球の抗腫瘍細胞毒性活性と、炎症反応で観察される局所的組織変化に関与している。

(5) マクロファージ遊走を阻止するMIF因子

(6) マクロファージの化学走性因子である補体断片C5a

本発明の目的にとり、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IFN -  $\gamma$ 、GM-CSFおよびTNF $\beta$ が最も特に好ましい。

(II)

共刺激分子とは、免疫および/または炎症反応に間接的に関与する、細胞表面に存在する分子；例えば、免疫系の細胞により認識されうる形をした抗原の提示プロセスに関与する分子である。

本発明の目的に有用である共刺激分子に関して、以下のものが特に挙げられる：

(1) 主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の抗原。ヒトでは、ほとんどの

有核細胞がそれらの表面で可変量のクラス I 抗原を発現し、一方クラス II 抗原は B リンパ球、食細胞および活性化 T リンパ球に限定された分布を有している。これらの細胞表面マーカーは、特に T リンパ球と APC 細胞とのおよび Tc リンパ球と表面で非自己抗原を提示する標的細胞との相互作用について前記されたような免疫認識の現象に関与する。このためこれは、腫瘍部位で MHC 抗原の発現を増加させることによって免疫応答の強度が改善されることを示唆している。

(2) ヒトマーカー CD 27、CD 28、CD 30 および CD 40 に関するリガンド。特に、マーカー CD 40 のリガンドは活性化 T リンパ球の表面に位置し、B リンパ球の刺激および増殖に関与している。他方、インビトロ研究ではマーカー CD 27 および CD 30 のリガンドが T リンパ球の増殖を誘導することを示した。一部の著者によりタンパク質 B7 と称されているマーカー CD 28 のリガンドに関して、これは APC により合成され、NK 細胞により表面で非自己抗原を提示する標的細胞の認識に関与し、それによってそれらの破壊を行う。

(3) リンパ球機能抗原タイプ 1 LFA - 1 (白血球機能抗原)。これはすべての白血球に共通してマクロファージ上にも存在する表面レセプターであり、非特異性細胞付着現象で重要な部分を果たす。後者は炎症部位への免疫系の細胞の遊走に関与することで化学走性プロセスに関係している。

(4) 多くの細胞タイプの表面に存在する細胞間付着分子タイプ 1 (ICAM - 1)。ICAM - 1 は LFA - 1 分子に関するリガンドの 1 つである。

(III)

上記のように、ケモカインは炎症部位付近または炎症部位で合成されて、免疫系の細胞をこの部位に運ぶ分子である。一般的に言えば、ケモカインは一方で白血球の表面に存在する付着分子と、他方で内皮細胞の表面に存在する付着分子との相互作用を介して作用する (例えば LFA - 1 および ICAM - 1)。管壁の内皮細胞への白血球の付着に続いて、炎症部位にそれらが遊走する。

本発明の目的に有用であるケモカインに関して、以下のものが特に挙げられる：

(1) PF - 4 (血小板因子 - 4 ; Denel et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA, 74, 2256)

(2) RANTES (様々なタイプの白血球に関する化学走性因子) (Schall et al., 1988, J. Immunol., 141, 1018)、および

(3) ACT-2 (Ziptel et al., 1989, J. Immunol., 142, 1587)。これはMHCクラス I 分子と関連した抗原の認識に関与するTリンパ球の付着を促進するタンパク質である。

(IV)

本発明の目的に有用であるモノクローナル抗体は、例えば細胞表面マーカーCD2、CD3、CD28またはCD40に対するものである。事実、一部の研究ではTリンパ球増殖の刺激に関してこのような抗体の役割を示した。

(V)

本発明の目的に有用であるスーパー抗原は、例えば狂犬病ウイルス核タンパク質、あるいは特にStaphylococcus属の細菌により産生される細菌エンテロトキシンである。

(VI)

本発明の目的に有用であるポリペプチド性質のアジュバントは、例えば20S“層”細菌遺伝子の発現産物である。

本発明から生じる医薬品は哺乳動物、最も具体的にはヒトでがんの治療用として考えられている。こうして治療されるがんは、乳、肺および結腸がんのような固形腫瘍であることが有利である。このような医薬品は、更に具体的には、多くのタイプのがんでよく出会う合併症であって、しかも満足できる療法が現在存在しない二次腫瘍を治療することを可能にすることが注目される。

本発明から生じる医薬品は、常用されるいずれか一般的な経路、特に全身的、

筋肉内、皮下または腹腔内のような非経口で投与される。一般的に言えば、静脈内投与が特に有利であると思われる。一方、アクセスしうる腫瘍の場合には、医薬品は腫瘍部位への直接注射または局所適用により投与してもよい。一般的に言えば、投与は1回分の用量で、反復した用量で、またはある時間間隔後に何回も行う。

本発明の好ましい態様によれば、医薬品は治療活性量の前記ウイルスベクター以外にも、薬学的観点から許容されるキャリアを含む。それは薬学的観点から許容されるビヒクル、希釈剤またはアジュバントを含んでいてもよく、液体または凍結乾燥形で供給される。

適切な投与量は、異なるパラメーター、例えば投与経路、治療される個体、腫瘍状態の性質および重篤度、用いられるウイルスベクターのタイプ、あるいは調節物質についてコードする遺伝子に応じて変わる。適切な投与量を評価できる基準の1つは、調節物質の血清活性の測定である。これらの活性試験は標準試験である。特に、IL-2生物活性試験が挙げられる (Gillis et al, 1978, J. Immunol., 120, 2027-2032)。しかしながら、一般的に、キロ当たりのウイルスベクターの用量は $10^4 \sim 10^{11}$ 、有利には $10^7 \sim 10^{10}$ 、好ましくは $10^7 \sim 10^9$ プラーク形成単位 (p f u) /キロである。

最後に、本発明の主題は：

(i) 発現に必要な要素の制御下に置かれた、がん細胞の破壊に関与する少なくとも1つの物質 (agent)、例えば免疫および/または炎症応答を調節する物質、についてコードする1以上の遺伝子を含むDNA断片がゲノム中に挿入され、特に前記物質が特異的にがん腫瘍に送達される、がん細胞に正の親和性を示すウイルスベクターの使用、

(ii) 治療に必要な個体が、がん細胞の破壊に関与する少なくとも1つの物質、例えば免疫および/または炎症応答を調節する物質、についてコードする1以上

の遺伝子を含むDNA断片がゲノム中に挿入されたウイルスベクターの、薬学的観点から有効な量で注射されることからなる、哺乳動物におけるがん治療方法、および

(iii) 物質の全部または一部についてコードする1以上の遺伝子を含むDNA断片がゲノム中に挿入されたウイルスベクターが全身投与されることからなる、がん細胞の破壊に関与する物質、例えば免疫および/または炎症応答を調節する物質、を特異的に送達するための方法である。



本発明は下記例で説明されるが、それらに制限されない。

例

例1：サイトカインについてコードする遺伝子をもつ組換えワクシニアウイルスの作製

下記の作製はManiatisら（1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）で詳述された遺伝子工学および分子クローニングの一般的技術に従い行う。細菌プラスミドを用いるクローニング工程のすべては宿主株としてEscherichia coli (E. coli) 株 5 K または X L 1 - Blue (Stratagene) を用いて行い、一方ファージ M 1 3 に由来するベクターを用いる場合はE. coli NM522で行う。

合成オリゴデオキシヌクレオチドによる部位特定変異誘発では、ZollerおよびSmith(1982, Nucleic Acids Res., 10, 6487)により記載されたプロトコルを適用し、市販元のキットを製造業者の推奨に従い用いる。

GM - C S F、I L - 4、I L - 5、I L - 6 および I L - 7 についてコードする遺伝子を含んだDNA断片を、ワクシニアウイルス 7. 5 K プロモーターの下流におけるトランスファーベクター中へそれらを挿入する目的で適切な制限部位を導入するように、部位特定変異誘発工程に付す。2つのトランスファーベク

ター、即ち p T G 1 8 6 - ポリ（特許出願 E P 2 0 6, 9 2 0 で記載されている）および p T G 1 9 4 を用いる。後者はポリリンカーの向きの点で p T G 1 8 6 - ポリと異なる。

更に詳しくは：

Goughら(1984, Nature, 309, 763)で記載されたようなネズミ GM - C S F についてコードする c D N A をもつ断片を、翻訳開始 A T G に対して - 1 7 位に B a m H I 部位を作るように、M 1 3 T G 1 3 0 (Kieny et al., 1983, Gene, 26, 91) 中へのクローニング後に部位特定変異誘発に付す。それによるベクターから単離された B a m H I - S a l I 断片は p T G 1 9 4 の同部位間に挿入する。

Leeら(1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2061)に記載されたようなネズミ I L - 4 についてコードする c D N A をもつ E c o R I - B a m H I 断片をベクター

M13TG130中に導入し、翻訳開始ATGのすぐ上流でBglII部位を作るように部位特定変異誘発に付す。こうして処理されたベクターをEcoRIおよびBglIIで切断し、相当する断片をpTG194と同様の部位間に導入する。

Kinashiら(1986, Nature, 324, 70)で記載されたようなネズミIL-5についてコードするcDNAをもつEcoRI-BamHI断片を最初にベクターM13TG130中にサブクローニングし、その後翻訳開始ATGに対して-10位にPstI部位および-3位にAを導入するように部位特定変異誘発に付す。こうして処理されたベクターをEcoRIおよびPstIで切断し、相当する断片をpTG186-ポリと同様の部位間に挿入する。

Van Snickら(1988, Eur. J. Immunol., 18, 193)で記載されたようなネズミIL-6についてコードするcDNAをもつEcoRI断片をベクターM13TG131 (Kienyら、前掲) 中にサブクローニングし、翻訳開始ATGに対して-9位にBamHI部位および-3位にAを導入するように部位特定変異誘発に付す。こうして処理されたベクターをEcoRIおよびBamHIで切断し、相当する

断片をpTG194のBamHIおよびEcoRI部位間に挿入する。

Namanら(1988, Nature, 333, 571)で記載されたようなネズミIL-7についてコードするcDNAをもつSstI-HindIII断片をベクターM13TG130中にサブクローニングし、翻訳開始ATGに対して-11位にEcoRV部位および-3位にAを作るように部位特定変異誘発に付す。EcoRV-PstI断片をこうして得られたベクターから単離し、pTG194のSmaIおよびPstI部位間にクローニングする。

上記で得られたトランスファーベクターを用いて、対応ワクシニアウイルスをKienyら(1984, Nature, 312, 163)で記載されたような相同的組換え方法に従い作製する。こうして得られた組換えウイルスはVV-GM-CSF、VV-IL-4などと命名する。

他の組換えワクシニアウイルス、特に(i) ヒトIL-2 (特許出願EP206, 939)、(ii) ヒトIL-6 (Nakagawa et al., 1991, Eur. Cytokine Net., 2, 11-16) および(iii) ヒトIFN- $\gamma$  (特許出願EP206, 920) につい

てコードする cDNA を含んだものは、既に記載されている。

例2：IL-6についてコードする遺伝子を含むワクシニアウイルス  
(VV-IL-6)による腫瘍担持ヌードSwissマウスの処置

1. 腫瘍担持ヌードSwissマウスの作製

ヒト結腸直腸腫瘍に由来する細胞系 SW948 (ATCC CCL 237) を供給業者の推奨に従い連続的に培養する。収集された細胞をトリプシン、その後デオキシリボヌクレアーゼ (10 µg/ml) で5分間処理する。次いでそれらを PBS (Dulbeccoリン酸緩衝液; Sigma, D5652) で洗浄し、 $10^7$ 細胞/100 µl の濃度でこの同緩衝液に再懸濁する。

6～8週齢雌性ヌードSwissマウス (Iffa Credo, France) に各々こうして得られた細胞懸濁液 100 µl を皮下投与する。7日後、触知しうる腫瘍をもつマ

ウスを選択する。

2. 試験

これらのマウスを約8匹の群に分ける。2群は参照群として使うことを目的とする：マウスにトランスファーベクター pTG186 - ポリから生じた TK<sup>-</sup> 非組換えワクシニアウイルス (VV-186)  $10^7$  または  $10^8$  p.f.u. を投与する。第三群のマウス (陰性コントロール群) には PBS 100 µl だけを投与する。最後に、他の2群のマウスには例1で得られた VV- (ネズミ IL-6)  $10^7$  または  $10^8$  p.f.u. を投与する。

ウイルスを PBS 溶液に入れて尾において静脈内投与する。

注射から7日後に、下記のように血液、器官および腫瘍のウイルス含有率について分析するために、マウス3匹を各群から取出して屠殺する。

腫瘍および異なる器官 (肝臓、脾臓、脳など) は摘出してトリプシンで処理し、懸濁物が得られるまで機械的に攪拌する。血液サンプルを 20 mM EDTA を含む等容量の PBS 緩衝液で希釈する。

こうして得られた細胞を PBS で2回洗浄し、10%の牛胎児血清を含む Dulbecco MEM 培地 (修正イーグル培地; Gibco BRL) に再懸濁する。細胞 (生存および非生存) の数を常法に従い計測することで調べる。次いで10倍連続希釈

をPBS緩衝液で行う。各希釈液 $1\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ または $100\mu\text{l}$ を直径 $3\text{cm}$ のペトリ皿(Falcon 3001)で確立されたBHK細胞の培養物に加える。皿を $5\%$   $\text{CO}_2$ 中 $37^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートし、溶解ブランクを翌日計数する。

屠殺されたマウスについて、腫瘍の増殖過程はスライディングキャリパーを用いて腫瘍の長さ、幅および深さを測定することにより経時的に記録する。各腫瘍の容量は楕円体 $4/3\pi r_1 r_2 r_3$ に関する式を適用することにより計算するが、ここで $r_1$ 、 $r_2$ および $r_3$ は各々半分に減少させた長さ、幅および深さを表す。

### 3. 結果

注入されたウイルスのタイプにかかわらず、腫瘍細胞の感染のレベルは健全組織の場合よりもかなり大きいことがわかった。

VV-IL-6を投与したマウスの腫瘍の増殖は、用量にかかわらず、コントロール群および陰性参照の場合よりも少ない。一部のマウスはVV-IL-6の投与後約15日間で腫瘍の完全退縮を示す。

例3：IL-2についてコードする遺伝子を含むワクシニアウイルス

(VV-IL-2)による腫瘍担持DBA/2マウスの処置

例2を：

(i) 特許出願EP206, 939で記載されたような、ヒトIL-2についてコードする遺伝子を含んだワクシニアウイルス

(ii) DBA/2マウス肥満細胞腫に由来するネズミ細胞系P815(ATCC TIB 64)、および

(iii) 6～8週齢雌性DBA/2マウス(Iffa Credo, France)を用いて繰返す。

変更点は次のとおりである： $100\mu\text{l}$ の容量中 $10^5$ P815細胞をDBA/2マウスに注射する。 $10^8\text{p.f.u.}$ のウイルスを各群のマウスに注射する。生物学的分析に使うためのマウスは注射後3日目に各群から取出す。

例2で報告された場合に匹敵する結果が観察された。

例4：GM-CSFについてコードする遺伝子を含むワクシニアウイルス

(VV - GM - CSF) による腫瘍担持DBA/2マウスの処置

例3を $10^8$  p f uのVV - GM - CSFを用いて繰返す。腫瘍の増殖の過程は例1で記載されたように経時的に記録する。前記のように、コントロール群および陰性参照と比較した腫瘍の増殖の遅延化が試験群の一部動物で観察される。10匹中3匹のマウスがウイルスペクターの投与後15日間で腫瘍の完全退縮を示す。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. <b>PCT/FR 94/01133</b>				
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/24 C12N15/26 C07K14/55 C07K14/54 C07K16/28 C07K14/74 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/27 C07K14/535				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C07K C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.90, no.10, 15 May 1993, WASHINGTON US pages 4645 - 4649 PLAUTZ, G. ET AL. 'Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors' cited in the application see the whole document ---	1,3,10, 11,13		
X	WO,A,92 20356 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 26 November 1992 see claims 47,48,56,61,62,77,78,89 -----	1-3, 9-11,14, 16,17		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search <b>1 February 1995</b>		Date of mailing of the international search report <b>18-05-1995</b>		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2210 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 21 651 cpo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>CHAMBONNET, F</b>		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 94/01133

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  

Remark: Although Claims 18 to 20 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annexed sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:  
3 et partially 1, 2, 9 to 20

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

NON-UNITY OF INVENTION

1. Claims: 3 and, in part, 1, 2, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for all or some cell surface co-stimulating molecules, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.
2. Claims: 4 and, in part, 1, 2, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for all or some chemokines, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.
3. Claims: 5 and, in part, 1, 2, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for all or some monoclonal antibodies directed against lymphocyte surface markers, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.
4. Claims: In part, 1, 2, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for all or some super-antigens characteristic of an infectious organ, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.
5. Claims: In part, 1, 2, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for all or some additive-function polypeptides, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.
6. Claims: 6 to 8 and, in part, 9 to 20  
Use of a viral vector, into the genome of which an ADN fragment is inserted comprising one or more genes coding for at least one cytokine, for the preparation of a medicament for treating cancer in mammals.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 94/01133

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9220356	26-11-92	US-A- 5342774	30-08-94
		AU-A- 2158392	30-12-92
		CA-A- 2109727	26-11-92
		EP-A- 0595838	11-05-94
		JP-T- 6511144	15-12-94
		NO-A- 934130	23-11-93
-----			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 39/00		9637-4B	C 1 2 P 21/02	K
39/39		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
39/395		9051-4C	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/02		9051-4C	37/66	